



**Actividad antifúngica
de aditivos alimentarios
in vitro y como
ingredientes de
recubrimientos
comestibles a base de
hidroxipropil
metilcelulosa contra
Monilinia fructicola
en ciruelas**

RESUMEN

La podredumbre marrón, causada por *Monilinia fructicola*, es una de las principales enfermedades que afecta a la fruta de hueso en poscosecha. En ensayos *in vitro* se evaluó la actividad antifúngica de distintos aditivos alimentarios, que incluían sales orgánicas y parabenos. Trece de los quince agentes evaluados inhibieron el crecimiento radial del hongo. Los agentes y las concentraciones seleccionados fueron evaluados *in vivo* como ingredientes de recubrimientos comestibles a base de hidroxipropil metilcelulosa en ciruelas inoculadas con *M. fructicola*. Los recubrimientos formulados con bicarbonatos amónico (0,2%) o sódico (2%), parabenos sódico (0,1%) y sorbato potásico (1%) fueron los más efectivos reduciendo la incidencia de la enfermedad. Todos los recubrimientos inhibieron el desarrollo de la podredumbre, destacando los que contenían carbonato o bicarbonato amónico (0,2%), y parabenos sódicos (0,1%). Los resultados muestran el potencial de los recubrimientos como alternativa para el control de la podredumbre marrón de ciruelas.

Palabras clave: Fruta de hueso, *Prunus salicina*, Enfermedades de poscosecha, Control alternativo, Podredumbre marrón.

ABSTRACT

Antifungal activity of food additives *in vitro* and as ingredients of hydroxypropyl methylcellulose edible coatings to control *Monilinia fructicola* on plums.

Common food preservative agents were evaluated in *in vitro* tests for their antifungal activity against *Monilinia fructicola*, the most economically important pathogen causing postharvest disease of stone fruits. Thirteen out of fifteen agents tested completely inhibited the radial growth of the fungus. The effective agents and concentrations were tested as ingredients of hydroxypropyl methylcellulose edible coatings against brown rot disease on plums inoculated with *M. fructicola*. Coatings containing 0.2% ammonium bicarbonate, 2% sodium bicarbonate, 0.1% sodium paraben and 1% potassium sorbate significantly reduced brown rot incidence. All the tested coatings reduced disease severity to some extent, but coatings containing 0.1% sodium methylparaben or sodium ethylparaben or 0.2% ammonium carbonate or ammonium bicarbonate were superior to the rest. Overall, the results showed that the application of elected antifungal edible coatings is a promising alternative for the control of postharvest brown rot in plums.

Key words: Stone fruit, *Prunus salicina*, Postharvest diseases, Alternative control, Brown rot.

V. TABERNER¹, H. KARACA³, L. PALOU¹,
M^a B. PÉREZ-GAGO^{1,2}

(1) Centre de Tecnologia Postcollita (CTP), Institut Valencià d'Investigacions Agràries (IVIA).

(2) Fundación Agroalimed.

(3) Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, Pamukkale University, 20070 Camlik, Denizli, Turkey.

La podredumbre marrón es una de las principales enfermedades que afectan a la fruta de hueso (ciruelas, melocotones, nectarinas, cerezas, albaricoques...) en la etapa poscosecha, generando importantes pérdidas económicas. Dicha enfermedad está causada por hongos del género *Monilinia* (sinónimo: *Monilia*), siendo las especies más representativas *M. laxa* (Aderh. & Ruhl.) Honey, *M. fructicola* (G. Wint.) Honey y *M. fructigena* Honey ex Whetzel (CASALS *et al.*, 2010). Hasta hace pocos años, *M. fructicola* y *M. fructigena* no estaban presentes en Europa y América, respectivamente. Sin embargo, *M. fructicola* se ha introducido recientemente en Europa, siendo detectada en España por primera vez en el año 2006. Desde entonces, se ha convertido en la causa más frecuente de podredumbre marrón en melocotones y otras frutas de hueso en nuestro país (VILLARINO *et al.*, 2013). Estos patógenos pueden infectar en el campo a flores y frutos jóvenes, permanecer en estado latente y desarrollar los síntomas de la enfermedad en poscosecha, aunque también pueden actuar como patógenos de herida en frutos maduros (SPOTTS *et al.*, 1998). Ambos tipos de infección pueden ocasionar elevadas pérdidas en poscosecha, pudiendo alcanzar valores de hasta el 90% si las condiciones son favorables para el desarrollo fúngico (MARI *et al.*, 2007). Por tanto, uno de los retos principales del sector español de la fruta de hueso fresca es encontrar tratamientos antifúngicos de poscosecha, que junto con medidas adecuadas en campo, permitan alargar al máximo el tiempo de conservación sin que ello afecte a la calidad

del fruto. Sin embargo, a excepción del fludioxonil cuyo uso se ha autorizado en las últimas campañas como medida de excepción, no existen tratamientos de poscosecha autorizados ni productos fungicidas registrados para el control de podredumbres de poscosecha en fruta de hueso en la Unión Europea (UE). Teniendo en cuenta tanto las limitaciones en la legislación como las exigencias de los mercados y los consumidores de productos sanos, libres de residuos químicos y que garanticen la seguridad alimentaria, es necesario el desarrollo de estrategias alternativas no contaminantes para el control de la podredumbre marrón en la poscosecha de la fruta de hueso.

Varios trabajos demuestran la efectividad de ciertos aditivos alimentarios para el control de podredumbres en la poscosecha de frutas y hortalizas, generalmente aplicados mediante baños en soluciones acuosas (MONTESINOS-HERRERO *et al.*, 2009; MOSCOSO-RAMÍREZ *et al.*, 2013) o formando parte de recubrimientos comestibles (VALENCIA-CHAMORRO *et al.*, 2008, 2009; FAGUNDES *et al.*, 2013). Los recubrimientos comestibles aplicados a frutas y verduras ofrecen una barrera semipermeable a gases y al vapor de agua que reduce la respiración y la pérdida de peso y puede ayudar a mantener la firmeza de los productos recubiertos (VALENCIA-CHAMORRO *et al.*, 2009). Por otra parte, la incorporación en su formulación de agentes antimicrobianos, antioxidantes, aromas, u otros aditivos alimentarios, aumenta sus propiedades funcionales. En este sentido, la incorporación de sustancias naturales o generalmente reconocidas como seguras (GRAS, “generally recognized as safe”), tales como algunos ácidos orgánicos y sus sales, parabenos y sus sales, etc., a recubrimientos comestibles ha resultado en tratamientos efectivos contra *Penicillium* (VALENCIA-CHAMORRO *et al.*, 2008, 2009), *Aspergillus* (MEHYAR *et al.*, 2011), *Botrytis* o *Alternaria* (FAGUNDES *et al.*, 2013) en distintos productos hortofrutícolas. En fruta de hueso, varios aditivos alimentarios y sustancias GRAS, aplicados generalmente mediante baños en soluciones acuosas, han controlado satisfactoriamente la podredumbre marrón (CASALS *et al.*, 2010, PALOU *et al.*, 2009). Sin embargo, no hay información disponible acerca del empleo de estas sustancias como ingredientes de recubrimientos comestibles para el control de enfermedades de poscosecha en fruta de hueso. Por tanto el objetivo de este estudio fue determinar la activi-

dad antifúngica *in vitro* contra *M. fruticola* de varios agentes antimicrobianos ampliamente empleados en la industria alimentaria y evaluar el efecto de los más efectivos como ingredientes de recubrimientos comestibles a base de hidroxipropil metilcelulosa (HPMC)–lípidos sobre la incidencia y la severidad de la podredumbre marrón en ciruelas inoculadas artificialmente con *M. fruticola*.

Materiales y métodos

Patógeno e inóculo fúngico

La cepa *M. fruticola* MeCV-2, aislada de melocotón podrido procedente de la zona de Carlet (Valencia) y seleccionada por su patogenicidad, se sembró en patata dextrosa agar (PDA) en placas petri y se incubó a 25°C durante 7 a 14 días antes de cada experimento. Para los ensayos *in vitro*, con un sacabocados metálico esterilizado de 5 mm de diámetro, se recortaron de dichos cultivos discos de agar con el patógeno desarrollado. Para los ensayos *in vivo*, se prepararon suspensiones conidiales de alta densidad. Con un asa de platino esterilizada se tomaron esporas de la superficie de la placa que se suspendieron en una mezcla estéril de agua y Tween-80 y se determinó la concentración con un hematocítmetro, que se ajustó a la dosis de 1×10^3 esporas/ml.

Aditivos alimentarios

En el Cuadro 1 se muestran los nombres, acrónimos y códigos E de aditivo alimentario establecidos por la UE de los agentes antifúngicos empleados en este estudio. Dichos aditivos, con una pureza mínima del 99% se adquirieron de Sigma-Aldrich CEIME (Steinheim, Germany), Fluka Chemie AG (Buchs, Suiza), Panreac Química S.L.U. y Merck KgaA (Darmstadt, Alemania). El silicato de potasio (PSi) se obtuvo del producto comercial Sil-Matrix® (29% PSi), de la casa PQ Corporation (Valley Forge, PA, EE.UU.).

Fruta

Se emplearon ciruelas japonesas (*Prunus salicina* Lindl.) de las variedades ‘Friar’ y ‘Larry Ann’, procedentes de la Cooperativa del Camp de Llutxent-Otos S.C.V. (Llutxent, Valencia) directas de campo, que se transportaron al Centro de Tecnología Poscosecha del IVIA sin haberles aplicado ningún tratamiento poscosecha. Se seleccionaron frutos sanos, con ausencia de heridas o lesiones que se mezclaron

aleatoriamente, se lavaron con detergente biodegradable, se enjuagaron con agua de red y se dejaron secar al aire a temperatura ambiente.

Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de los aditivos alimentarios

Se evaluó el efecto de los agentes sobre el crecimiento micelial de *M. fructicola* en placas petri de 90 mm de diámetro que contenían el medio PDA con los correspondientes antimicrobianos disueltos a las concentraciones de 0,2, 1,0 y 2% (v/v), o bien de 0,01, 0,05 y 0,1% en el caso de los parabenos, ya que la aplicación de estos compuestos sobre frutas procesadas está autorizada en Europa a una dosis máxima del 0,1%. Se prepararon soluciones madre de cada agente y se añadió a PDA estéril a 45–55°C el volumen necesario para lograr las concentraciones deseadas en cada caso. Las placas se dejaron enfriar y posteriormente se colocó en el centro de la superficie de cada una de ellas un disco de agar con *M. fructicola*, según se ha descrito en la sección de preparación del inóculo para el ensayo *in vitro*. Como control se inocularon placas que contenían únicamente PDA, sin antimicrobiano. Las placas inoculadas se incubaron a 25°C en la oscuridad durante 3, 5, 7 y en algunos casos 14 días y se determinó en cada una de ellas el crecimiento micelial, calculando la media de dos diámetros perpendiculares de la colonia fúngica. Para cada agente antimicrobiano y concentración se emplearon cuatro repeticiones o placas. Los resultados se expresaron como el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial, de acuerdo a la fórmula: $(dc-dt) / dc \times 100$, donde *dc* = diámetro promedio de las colonias fúngicas en las placas control y *dt* = diámetro promedio de las colonias fúngicas en las placas con los agentes antimicrobianos.

Formulación y preparación de los recubrimientos antifúngicos

Los recubrimientos comestibles consistieron en emulsiones de HPMC (Methocel E15, Dow Chemical Co, Midland, MI, EE.UU.) y cera de abeja (Fomesa Fruitech S.L., Valencia), a las que se incorporaron los aditivos alimentarios. Todas ellas contenían un 7% de sólidos y 40% de cera de abeja (p/p, en base seca, b.s.) y mantenían ratios constantes de HPMC–plastificante (2:1) y cera de abeja–emulsificante (5:1). Las concentraciones de los aditivos alimenta-

CUADRO 1. Agentes antimicrobianos evaluados *in vitro* o *in vivo* como ingredientes de recubrimientos comestibles para la inhibición de *Monilinia fructicola*.

Agente antimicrobiano	Acrónimo	Código E ^a
Acetato sódico	SA	E–262 (i)
Benzoato sódico	SB	E–211
Bicarbonato amónico	ABC	E–503 (ii)
Bicarbonato potásico	PBC	E–501 (ii)
Bicarbonato sódico	SBC	E–500 (ii)
Carbonato amónico	AC	E–503 (i)
Carbonato potásico	PC	E–501 (i)
Carbonato sódico	SC	E–500 (i)
Diacetato sódico	SDA	E–262 (ii)
Etil parahidroxibenzoato sódico	SEP	E–215
Formiato sódico	SF	E–237
Metil parahidroxibenzoato sódico	SMP	E–219
Propionato sódico	SP	E–281
Silicato potásico	PSi	E–560
Sorbato potásico	PS	E–202

rios antimicrobianos (0,1–2%, p/p) se seleccionaron previamente como más efectivas en los ensayos *in vitro*. Como plastificante se usó glicerol y como emulsificante ácido esteárico, a excepción de la formulación con propionato sódico (SP) en la que se empleó Tween–80. En los recubrimientos que contenían carbonato sódico (SC) o bicarbonato sódico (SBC) se añadió también un agente antiespumante (FG–1510, Dow Corning Ibérica, Barcelona). Las emulsiones se realizaron a 90–95°C con un homogenizador de alta velocidad y tras añadir los correspondientes agentes antimicrobianos disueltos en agua se enfriaron en baño de hielo manteniendo la agitación hasta alcanzar una temperatura inferior a 25°C. Las emulsiones se guardaron a 10°C hasta ser empleadas y se evaluó su viscosidad (Visco Star plus R, Fungilab, S.A., Barcelona) y estabilidad tras 24 h a 25°C mediante la observación de la separación de fases.

Actividad curativa de los recubrimientos antifúngicos

Las ciruelas se inocularon con una suspensión de 1×10^3 esporas/ml de *M. fructicola* efectuando una herida de 1 mm de diámetro y 2 mm de profundidad en la zona ecuatorial del fruto con un punzón de



Foto 1. Inoculación de ciruela con *Monilinia fructicola*.

acero inoxidable previamente sumergido en la suspensión de esporas (Foto 1). Tras 24 h de incubación a 20°C, los frutos se recubrieron manualmente, aplicando a cada uno 200 ml de emulsión que se esparcieron uniformemente con las manos y se dejaron secar a temperatura ambiente sobre rejillas metálicas (Foto 2). Como tratamiento control se empleó un lote de ciruelas inoculadas pero no recubiertas. Una vez secos, los frutos se colocaron en alvéolos plásticos sobre cajas y se incubaron a 20°C y 90% HR. Cada tratamiento se aplicó a 3 repeticiones de 10 frutos. Tras 4, 6 y 8 días de incubación, se determinaron la incidencia (porcentaje de frutos infectados) y la severidad de la enfermedad (diámetro de las lesiones de los frutos infectados, en mm). Los resultados se expresaron como porcentajes de reducción respecto a los tratamientos control.

Análisis estadístico

Para cada día de evaluación se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) del porcentaje de reducción del crecimiento radial del hongo (ensayos

in vitro) y de la incidencia y la severidad de la enfermedad (ensayos *in vivo*) mediante el paquete informático Statgraphics 5.1 (Manugistics, Inc. Rockville, MD, EE.UU.). Para la incidencia, los datos se transformaron al arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje de frutos podridos. Las reducciones de la incidencia y de la severidad respecto al control se calcularon como porcentajes. Se presentan las medias no transformadas. Cuando aparecieron diferencias estadísticamente significativas, las medias se separaron mediante la prueba de la Mínima Diferencia Significativa (MSD) con un nivel de confianza del 95%.

Resultados y discusión

Actividad antifúngica de los aditivos alimentarios: Ensayos *in vitro*

En el Cuadro 2 se muestran los resultados obtenidos de la inhibición del crecimiento radial del micelio de *M. fructicola* en placas de PDA con los diferentes aditivos alimentarios y concentraciones estudiadas tras 7 días de incubación a 25°C. Los 15



Foto 2. Secuencia del recubrimiento de ciruelas mediante aplicación manual.

agentes antimicrobianos evaluados inhibieron el desarrollo fúngico y, en general, la efectividad aumentó al aumentar la concentración de los mismos. De todos los aditivos estudiados destacaron el carbonato amónico (AC), bicarbonato amónico (ABC) y SBC, que inhibieron completamente el crecimiento del patógeno a las tres concentraciones ensayadas. Numerosos estudios demuestran la potente acción inhibitoria de los carbonatos y bicarbonatos sobre el crecimiento de varios patógenos vegetales, lo que se atribuye en general al incremento del pH que provocan en el medio. Por ejemplo, en ensayos *in vitro* el SBC resultó efectivo inhibiendo *M. fructicola* (QIN *et al.*, 2006), *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* (DROBY *et al.*, 2003; PALMER *et al.*, 1997) y ABC inhibiendo *B. cinerea* (NIGRO *et al.*, 2006).

En este estudio, también se logró una completa inhibición del crecimiento de *M. fructicola* con benzoato sódico (SB) y bicarbonato potásico (PBC) al 2%, etil parahidroxibenzoato sódico (SEP) y metil parahidroxibenzoato sódico (SMP) a concentraciones iguales o superiores a 0,05%, y con SC, SP, car-

bonato potásico (PC), sorbato potásico (PS), diacetato sódico (SDA) y PSi a dosis del 1% o superiores. Otros trabajos también confirman la efectividad *in vitro* de dichos agentes sobre patógenos fúngicos vegetales, como por ejemplo los parabenos sobre *B. cinerea* (YILDIRIM y YAPICI, 2007), *Fusarium* spp. y *Penicillium* spp. (THOMPSON *et al.*, 1993), el PS sobre *M. laxa* (GREGORI *et al.*, 2008) o el PSi sobre *B. cinerea* y *Alternaria alternata* (FAGUNDES *et al.*, 2013).

Excepto SB, PBC y PSi, todos los agentes mencionados a las dosis indicadas (AC, ABC y SBC al 0,2, 1 y 2%; SC, SP, PC, PS y SDA al 1 y 2% y SMP y SEP al 0,05%) inhibieron completamente el crecimiento de *M. fructicola* también después de 14 días de incubación (datos no mostrados). El acetato sódico (SA) y formiato sódico (SF) no controlaron el desarrollo del hongo, lo que concuerda con la baja efectividad observada en otros trabajos con hongos como *B. cinerea* (NIGRO *et al.*, 2006) o *A. alternata* (FAGUNDES *et al.*, 2013). Como ejemplo, la Foto 3 muestra el halo de inhibición en PDA con PS, SMP y SBC a los 7 días de incubación a 25°C.

CUADRO 2. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *Monilinia fructicola* en placas petri de PDA con diferentes concentraciones de aditivos alimentarios antimicrobianos tras 7 días de incubación a 25°C.

Agente antimicrobiano	Inhibición de <i>M. fructicola</i> (%) ^a		
	Concentración del agente		
	0,2%	1,0%	2,0%
Acetato sódico	22,64 cA	62,21 bB	93,98 bC
Benzoato sódico	42,34 deA	91,92 cB	99,67 cC
Bicarbonato amónico	100,00 i A	100,00 eA	100,00 cA
Bicarbonato potásico	89,22 hA	98,01 dB	100,00 cC
Bicarbonato sódico	100,00 iA	100,00 eA	100,00 cA
Carbonato amónico	100,00 iA	100,00 eA	100,00 cA
Carbonato potásico	81,76 gA	100,00 eB	100,00 cB
Carbonato sódico	96,37 hiA	100,00 eB	100,00 cB
Diacetato sódico	35,83 dA	100,00 eB	100,00 cB
Etil parahidroxibenzoato sódico ^b	27,80 cA	100,00 eB	100,00 cB
Formiato sódico	0,00 aA	60,44 aB	92,50 aC
Metil parahidroxibenzoato sódico ^b	24,85 cA	100,00 eB	100,00 cB
Propionato sódico	54,37 fA	100,00 eB	100,00 cB
Silicato potásico	11,08 bA	100,00 eB	100,00 cB
Sorbato potásico	49,42 eFA	100,00 eB	100,00 cB

Medias en filas con letras mayúsculas diferentes y medias en columnas con letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes según la prueba de la MDS ($P < 0,05$) aplicada tras un ANOVA.

^a Reducción del diámetro de la colonia respecto a los tratamientos control (placas con PDA solo).

^b Las dosis evaluadas de los agentes fueron 0,01, 0,05 y 0,1% (CR EU, 2011).

Actividad curativa de los recubrimientos antifúngicos en ciruela: Ensayos *in vivo*

Los agentes antimicrobianos que mostraron mayor actividad antifúngica en los ensayos *in vitro* se incorporaron a su concentración mínima efectiva a la formulación del recubrimiento a base de HPMC-cera de abeja, seleccionando aquellos que formaron emulsiones estables y con una viscosidad adecuada para su aplicación *in vivo* como recubrimientos de ciruelas. En la *Figura 1* se muestran los resultados obtenidos de reducciones de la incidencia y de la severidad de la podredumbre marrón respecto al control en ciruelas inoculadas con *M. fructicola* y recubiertas 24 h después con los recubrimientos comestibles seleccionados que contenían los siguientes agentes antimicrobianos: SBC (2%), SDA (2%), PS (1%), SB (1%), SP (1%) PSi (1%), AC (0,2%), ABC (0,2%), SEP (0,1%) y SMP (0,1%).

Ningún recubrimiento logró controlar completamente la incidencia de la enfermedad. En general,

la reducción fue baja, siendo los recubrimientos que contenían bicarbonatos (ABC y SBC), sales de parabenos (SMP y SEP) y PS los únicos que redujeron la incidencia de la podredumbre marrón. De todos los agentes antimicrobianos, PS al 1% fue el más efectivo, con reducciones de la incidencia del 28,6%. Estos resultados concuerdan con los de varios trabajos con fruta de hueso encontrados en la literatura científica. Así, por ejemplo, los bicarbonatos resultaron efectivos en reducir la podredumbre marrón causada por *Monilinia* spp. en cerezas y melocotones (DROBY *et al.*, 2003, FELIZIANI *et al.*, 2013). PALOU *et al.* (2009) ensayaron varios aditivos alimentarios en soluciones acuosas para controlar la podredumbre marrón en melocotones artificialmente inoculados con *M. fructicola* 24 h antes y entre ellos PS a la concentración de 200 mM fue el más efectivo. PS al 1,5% redujo significativamente la aparición de infecciones causadas por *M. laxa* en cerezas, albaricoques y nectarinas, en un 61,6, 78,5 y 31,8%, respectivamente (MARI *et al.*, 2004).

Los recubrimientos antifúngicos evaluados en este estudio resultaron más efectivos reduciendo la severidad que la incidencia de la enfermedad. Esto indica que el efecto curativo de estos recubrimientos fue mayor sobre la capacidad de las hifas fúngicas de crecer y multiplicarse en las heridas infectadas (determinado por la variable severidad) que sobre la capacidad de las esporas de germinar e iniciar la infección (determinado por la variable incidencia). Por otra parte, es evidente que el periodo de tiempo transcurrido entre la inoculación y la aplicación del recubrimiento podría influir en la capacidad de controlar la enfermedad. En nuestro caso, se seleccionó un periodo de 24 h para simular la situación comercial habitual entre el tiempo existente entre la recolección, cuando es posible causar heridas en la piel de los frutos que son vía de entrada de esporas fúngicas, y la aplicación de tratamientos poscosecha en las empacadoras.

De todos los recubrimientos ensayados, los más efectivos reduciendo la severidad de la enfermedad fueron los que contenían parabenos sódicos al 0,1% (SEP y SMP), con reducciones del 50% respecto al control. Se ha demostrado la acción antifúngica de estos compuestos sobre distintos hongos de poscosecha (THOMPSON *et al.*, 1993; MOSCOSO-RAMÍREZ *et al.*, 2013). Incorporados a recubrimientos comestibles, estos agentes también fueron efectivos controlando las podredumbres verde y azul en cítricos (VALENCIA-CHAMORRO *et al.*, 2009) y las podredumbres gris y negra en tomates (FAGUNDES *et al.*, 2013). Entre los parabenos, el propil paraben (E-216) y su sal sódica (E-217) han sido recientemente excluidos de la lista positiva de aditivos alimentarios en la UE. En cambio se autoriza el uso de SMP y SEP en frutas y vegetales a una concentración máxima del 0,1% (CR EU, 2011).

Las formulaciones que contenían AC, ABC, SB y SP también fueron efectivas reduciendo la severidad respecto al testigo en un 37-46%. El PS, que fue el agente que mejor controló la incidencia de la podredumbre marrón, tuvo un efecto moderado sobre la severidad, con una reducción respecto al testigo del 35%. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por PALOU *et al.* (2009), según los cuales la incidencia y la severi-



AFRICAN ROSE

AFRICAN DELIGHT

ÁRBOLES FRUTALES



AFRICAN PRIDE



RUBY STAR

Producimos material certificado en:
Árboles, Patrones y Semillas



**VIVEROS
ORERO**

Vivero con categoría de
"Productor-Seleccionador"

DISPONEMOS DE LAS
MEJORES VARIEDADES
Y NOVEDADES
DEL MOMENTO



SEVILLA

41318 VILLAVERDE DEL RIO

Avda. de Brenes, s/n

Tel. 955 736 762 • 955 737 166

Fax 955 737 156

CASTELLÓN

12400 SEGORBE

Avda. Navarro Reverter, 1. Apdo. 9

Tel. 964 710 050

Fax 964 713 484

www.viveros-orero.com

e-mail: viveros-orero@viveros-orero.com

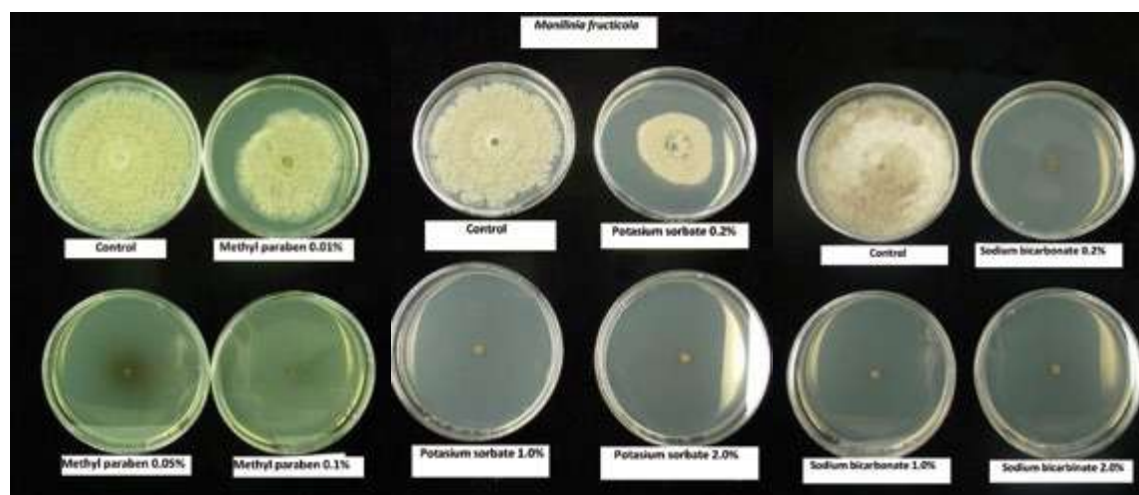
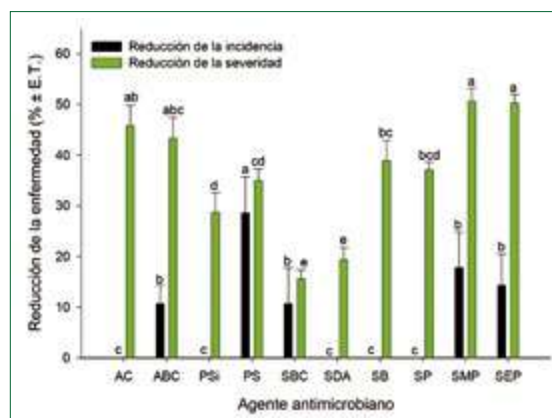


Foto 3. Inhibición *in vitro* de *Monilia fructicola* en placas petri de PDA con distintos aditivos alimentarios antifúngicos y control sin aditivo a los 7 días de incubación a 25°C.

dad de la podredumbre marrón se redujeron en un 35 y 25%, respectivamente, en melocotones tratados con PS tras 7 días de incubación a 20°C.

En este estudio, el efecto inhibitorio de los agentes evaluados *in vitro* o *in vivo* como ingredientes de recubrimientos comestibles variaron considerablemente. Por ejemplo, el SBC, uno de los agentes más efectivos *in vitro* contra *M. fructicola*, también redujo la incidencia y la severidad de la podredumbre marrón *in vivo*, aunque no fue uno de los tratamientos más efectivos. Del mismo modo, FAGUNDES *et al.* (2013) observaron notables diferencias en la efectividad de agentes antimicrobianos entre ensayos *in vitro* e *in vivo*. Según PARK *et al.* (2005), tales diferencias podrían deberse a la exposición real de las estructuras fúngicas a diferentes cantidades de los agentes. Mientras que en los ensayos *in vitro* las esporas están totalmente expuestas a los agentes antimicrobianos, cuando éstos son aplicados como ingredientes de recubrimientos deben ser difundidos gradualmente a la superficie del fruto para interactuar con las esporas, por lo que su acción antifúngica se ve limitada. Además, la difusión del agente también está condicionada por otros factores como la solubilidad o el coeficiente de reparto del agente en la piel del fruto, la cual varía según su estructura. Por estas razones, se deberían diseñar recubrimientos apropiados de forma específica para cada especie de fruta o incluso cultivar (VALENCIA-CHAMORRO *et al.*, 2009).

FIGURA 1. Reducciones de la incidencia y la severidad de la podredumbre marrón en ciruelas inoculadas artificialmente con *Monilia fructicola*, recubiertas 24 h después con recubrimientos comestibles a base de HPMC conteniendo los siguientes agentes a las concentraciones indicadas entre paréntesis, e incubadas 8 días a 20°C y 90% HR: Carbonato amónico (AC, 0,2%), Bicarbonato amónico (ABC, 0,2%), Silicato potásico (PSi, 1%), sorbato potásico (PS, 1%), Bicarbonato sódico (SBC, 2%), diacetato sódico (SDA, 2%), Benzoato sódico (SB, 1%), Propionato sódico (SP, 1%), Metil parahidroxibenzoato sódico (SMP, 0,1%) y etil parahidroxibenzoato sódico (SEP, 0,1%). Las reducciones de incidencia y severidad se determinaron respecto al control (fruta inoculada pero no recubierta). Para la incidencia, el ANOVA se aplicó a los valores transformados al arcoseno. Se muestran las medias no transformadas. Columnas con letras diferentes son significativamente diferentes ($P < 0,05$) según la prueba de la MDS aplicada tras el ANOVA.



Conclusiones

En este trabajo se ha demostrado el potencial de varios aditivos alimentarios como agentes antimicrobianos contra *M. fructicola*. De todos ellos, AC, ABC y SBC fueron los más efectivos en los ensayos *in vitro* e inhibieron completamente el crecimiento del patógeno en PDA a todas las concentraciones ensayadas. Sin embargo, ningún agente pudo prevenir la aparición de la podredumbre marrón en ciruelas, aunque el recubrimiento que contenía PS (1%) redujo la incidencia de la enfermedad en un 28,6%. Todos los recubrimientos evaluados redujeron significativamente la severidad de la enfermedad en ciruelas y los mejores resultados se obtuvieron con los recubrimientos que contenían AC (0,2%), ABC (0,2%), SEP (0,1%) y SMP (0,1%). En investigaciones futuras sería interesante determinar el efecto de la aplicación de estos recubrimientos comestibles a base de HMPC sobre la calidad y la capacidad de conservación en ciruelas. ●

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA, proyecto RTA2012-00061-00-00) y la Comisión Europea (Programa Feder). El Consejo Turco de Educación Superior financió la estancia del investigador Dr. Hakan Karaca en el CTP del IVIA.

Bibliografía

- CASALS, C., TEIXIDÓ, N., VIÑAS, I., SILVERA, E., LAMARCA, N., USALL, J. (2010). Combination of hot water, *Bacillus subtilis* CPA-8 and sodium bicarbonate treatments to control postharvest brown rot on peaches and nectarines. *Eur. J. Plant Pathol.* 128: 51–63.
- CR EU, (2011). Commission Regulation (EU) No. 1129/2011 of 11 November 2011 amending Annex II to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council by establishing a Union list of food additives. *Off. J. Eur. Union* L295, 1–177 (12/11/2011).
- DROBY, S., WISNIEWSKI, M., EL-GHAOUTH, A., WILSON, C.L. (2003). Influence of food additives on the control of postharvest rots of apple and peach and efficacy of the yeast-based biocontrol product Aspire. *Postharvest Biol. Technol.* 27: 127–135.
- FAGUNDES, C., PÉREZ-GAGO, M.B., MONTEIRO, A.R., PALOU, L. (2013). Antifungal activity of food additives *in vitro* and as ingredients of hydroxypropyl methylcellulose–lipid edible coatings against *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit. *Int. J. Food Microbiol.* 166: 391–398.
- FELIZIANI, E., SANTINI, M., LANDI, L., ROMANAZZI, G. (2013). Pre- and postharvest treatment with alternatives to synthetic fungicides to control postharvest decay of sweet cherry. *Postharvest Biol. Technol.* 78: 133–138.
- GREGORI, R., BORSETTI, F., NERI, F., MARI, M., BERTOLINI, P. (2008). Effects of potassium sorbate on postharvest brown rot of stone fruit. *J. Food Prot.* 71: 1626–1631.
- MARI, M., GREGORI, R., DONATI, I. (2004). Postharvest control of *Monilinia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in stone fruit by peracetic acid. *Postharvest Biol. Technol.* 33: 319–325.
- MARI, M., TORRES, R., CASALINI, L., LAMARCA, N., MANDRIN, J.F., LICHOU, J., LARENA, I., DE CAL, M.A., MELGAREJO, P., USALL, J. (2007). Control of post-harvest brown rot on nectarine by *Epicoccum nigrum* and physico-chemical treatments. *J. Sci. Food Agric.* 87: 1271–1277.
- MEHYAR, G.F., AL-QADIRI, H.M., ABU-BLAN, H.A., SWANSON, B.G. (2011). Antifungal effectiveness of potassium sorbate incorporated in edible coatings against spoilage molds of apples, cucumbers, and tomatoes during refrigerated storage. *J. Food Sci.* 76: 210–217.
- MONTESINOS-HERRERO, C., DEL RIO, M.A., PASTOR, C., BRUNETTI, O., PALOU, L. (2009). Evaluation of brief potassium sorbate dips to control postharvest *Penicillium* decay on major citrus species and cultivars. *Postharvest Biol. Technol.* 52: 117–125.
- MOSCOSO-RAMÍREZ, P.A., MONTESINOS-HERRERO, C., PALOU, L. (2013). Characterization of postharvest treatments with sodium methylparaben to control citrus green and blue molds. *Postharvest Biol. Technol.* 77: 128–137.
- NIGRO, F., SCHENA, L., LIGORIO, A., PENTIMONE, I., IPPOLITO, A., SALERNO, M.G. (2006). Control of table grape storage rots by pre-harvest applications of salts. *Postharvest Biol. Technol.* 42: 142–149.
- PALMER, C.L., HORST, R.K., LANGHANS, R.W. (1997). Use of bicarbonates to inhibit *in vitro* colony growth of *Botrytis cinerea*. *Plant Dis.* 81: 1432–1438.
- PALOU, L., SMILANICK, J.L., CRISOSTO, C.H. (2009). Evaluation of food additives as alternative or complementary chemicals to conventional fungicides for the control of major postharvest diseases of stone fruit. *J. Food Prot.* 72: 1037–1046.
- PARK, S.I., STAN, S.D., DAESCHEL, M.A., ZHAO, Y. 2005. Antifungal coatings on fresh strawberries (*Fragaria x ananassa*) to control mold growth during cold storage. *J. Food Sci.* 70: 202–207.
- QIN, G.Z., TIAN, S.P., XU, Y., CHAN, Z.L., LI, B.Q. (2006). Combination of antagonistic yeasts with two food additives for control of brown rot caused by *Monilinia fructicola* on sweet cherry fruit. *J. Appl. Microbiol.* 100: 508–515.
- SPOTTS, R.A., CERVANTES, L.A., FACTEAU, T.J., CHAND-GOYAL, T. (1998). Control of brown rot and blue mold of sweet cherry with preharvest iprodione, postharvest *Cryptococcus infirmo-minutus*, and modified atmosphere packaging. *Plant Dis.* 82: 1158–1160.
- THOMPSON, D.P., METEVIA, L., VESSEL, T. (1993). Influence of pH alone and in combination with phenolic antioxidants on growth and germination of mycotoxigenic species of *Fusarium* and *Penicillium*. *J. Food Prot.* 56: 134–138.
- VALENCIA-CHAMORRO, S.A., PALOU, L., DEL RÍO, M.A., PÉREZ-GAGO, M.B. (2008). Inhibition of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* by hydroxypropyl methylcellulose–lipid edible composite films containing food additives with antifungal properties. *J. Agric. Food Chem.* 56: 11270–11278.
- VALENCIA-CHAMORRO, S.A., PÉREZ-GAGO, M.B., DEL RÍO, M.A., PALOU, L. (2009). Curative and preventive activity of hydroxypropyl methylcellulose–lipid edible composite coatings containing antifungal food additives to control citrus postharvest green and blue molds. *J. Agric. Food Chem.* 57: 2770–2777.
- VILLARINO, M., EGÜEN, B., LAMARCA, N., SEGARRA, J., USALL, J., MELGAREJO, P., DE CAL, A. (2013). Occurrence of *Monilinia laxa* and *M. fructigena* after introduction of *M. fructicola* in peach orchards in Spain. *Eur. J. Plant Pathol.* 137: 835–845.
- YILDIRIM, I., YAPICI, B.M. (2007). Inhibition of conidia germination and mycelial growth of *Botrytis cinerea* by some alternative chemicals. *Pak. J. Biol. Sci.* 10: 1294–1300.